

2. PCR による函館産ダルス識別法の開発

食産業支援グループ

○清水健志

1. はじめに

道南地域には、食資源として利用できる多種多様な海藻が生息している。代表的な海藻に褐藻のマコンブがあり、うま味成分を多く含み、日本食には欠かせない食材である。現在、中国や韓国でもコンブが生産されているが、これらの産地に比べてブランド力を持つ函館産コンブは、高値で取引されている。

一方、今後の利用が期待される海藻の一つに紅藻のダルスが挙げられる。国内では北海道及び本州北部に分布しており、道南地域ではコンブ養殖施設に大量に自然繁茂する姿がよく見られるが、流通量は少なく希少な国産海藻である（図 1）。一方、海外では北米やヨーロッパ北部に分布しており、カナダやアイルランドでは、タンパク質やビタミン等の栄養成分を豊富に含む食材として古くから利用され、乾燥製品も販売されている（図 2）。近年では、タンパク質の主成分である色素タンパクが、強い抗酸化作用を示すことや血圧上昇に関わる酵素の活性を阻害するペプチドを含むこと等¹⁾の健康機能性に関する知見が報告されている。

マコンブやダルスのように海外でも生産されている地域資源では、ブランド価値を持つ産地である「函館産」、「北海道産」、「日本産」の証明に利用できる科学的手法を開発することにより、ブランド力を強化できるものと考えている。そこで本研究ではダルスについて、DNA 分析技術の一つである PCR を利用した函館産と海外産の識別法の開発について取り組んだ。



図1 コンブの養殖施設に自然繁茂するダルス



図2 海外のダルス製品（乾燥）

2. 実験方法

2.1 ダルス試料

函館産は南茅部地区で採取した生のダルス、海外産はアイスランド及びカナダで製造された乾燥ダルス（市販品）、加工食品のモデルには、函館産ダルスをを使用した佃煮（市販品）及びこの佃煮を異なるレトルト殺菌条件で処理した 3 種のレトルト佃煮（F 値 4.1、F 値 6.1、F 値 8.1）を調製して使用した。なお F 値とは、殺菌効力の指標であり、121.1℃の殺菌効力に換算した際の時間（分）を示す。

2.2 函館産ダルスに特徴的な塩基配列の探索

塩基配列の解析には、函館産及び海外産のダルスから抽出した DNA を用いた。各 DNA から PCR で増幅した COX1 遺伝子配列の一部を DNA シーケンサーで解読し、解析プログラムの ClustalW 及び NEBcutter v3 を用いた比較解析により函館産に特徴的な塩基配列及び制限酵素切断部位を探索した。

2.3 PCR を利用した函館産ダルス識別法の構築

函館産及び海外産から抽出した DNA を試料とし、PCR を基本とした 2 種類の手法（PCR-CAPS 法及び特異的 PCR 法）を利用した識別法の構築について検討した。PCR-CAPS 法は、特定の塩基配列を切断する酵素（制限酵素）を使用し、PCR で増幅した DNA 断片の切断の有無で識別する方法である（図 3）。ClustalW 及び

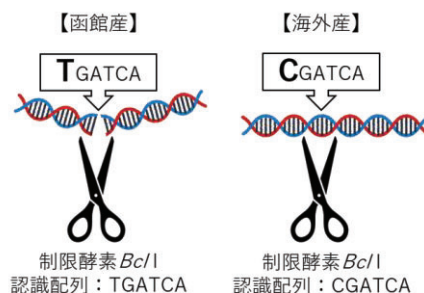


図3 PCR-CAPS法による識別の原理
制限酵素BclI(ハサミ)は、塩基配列のTGATCAは切断するが、CGATCAは切断しない。この特性を利用して塩基配列の差異を識別する。

NEBcutter v3 による比較解析で確認した函館産だけに存在する制限酵素 *Bcl* I の切断部位を利用し、この部位を含む DNA 断片を増幅する PCR 条件及び制限酵素により切断する条件を検討した。特異的 PCR 法は、PCR による DNA 断片の増幅の有無を指標に識別する方法である (図 4)。函館産と海外産との比較解析から得られた塩基配列情報を使用し、函館産は 2 本の DNA 断片、海外産は 1 本の DNA 断片が増幅される PCR 条件について検討した。さらに各手法について、佃煮及びレトルト佃煮から抽出した DNA を用いて加工食品への適応性を評価した。



図4 特異的PCR法による識別の原理
プライマーがDNAに結合すると、以降の塩基配列が増幅されるが、結合しないと増幅されない。この原理を利用して塩基配列の差異を識別する。

3. 結果及び考察

3.1 函館産ダルスに特徴的な塩基配列

函館産及び海外産の COX1 遺伝子の解析結果から、函館産だけに異なる塩基配列及び制限酵素切断部位があることを確認した (データ未掲載)。

3.2 函館産ダルス識別法の開発

PCR-CAPS 法を検討した結果、函館産及び海外産のいずれも約 200 塩基の DNA 断片が増幅され、さらに函館産の DNA 断片では、制限酵素 *Bcl* I で切断されることを確認した (図 5)。また特異的 PCR 法では、函館産で 2 本 (約 90 塩基と約 140 塩基)、海外産で 1 本 (約 140 塩基) の DNA 断片が増幅される条件を構築した (図 6)。また、PCR-CAPS 法では、DNA 断片の増幅量が F 値 8.1 のレトルト佃煮で減少したのに対し、特異的 PCR 法では、全ての試料で差がほとんど見られないことが明らかとなった。

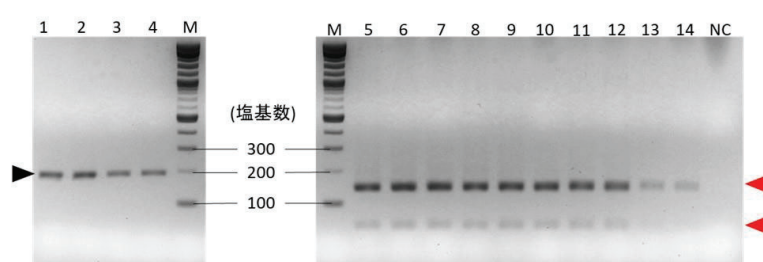


図5 PCR-CAPS法による函館産と海外産のダルスの識別

M: サイズマーカー、1-2: カナダ産、3-4: アイスランド産、5-6: 函館産、7-8: 佃煮、9-10: レトルト佃煮 (F値: 4.1)、11-12: レトルト佃煮 (F値: 6.1)、13-14: レトルト佃煮 (F値: 8.1)、NC: 陰性コントロール (DNA無)、黒矢印: 未切断の増幅DNA、赤矢印: 切断された増幅DNA

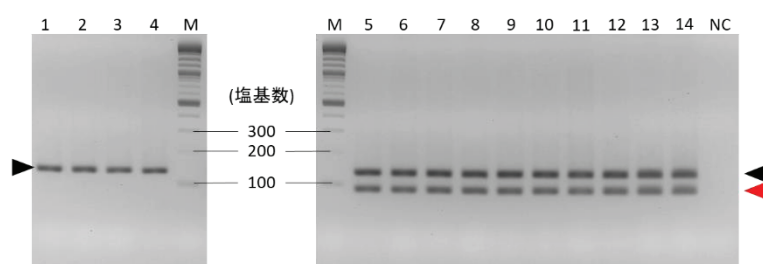


図6 特異的PCR法による函館産と海外産のダルスの識別

M: サイズマーカー、1-2: カナダ産、3-4: アイスランド産、5-6: 函館産、7-8: 佃煮、9-10: レトルト佃煮 (F値: 4.1)、11-12: レトルト佃煮 (F値: 6.1)、13-14: レトルト佃煮 (F値: 8.1)、NC: 陰性コントロール (DNA無)、黒矢印: 共通プライマーによる増幅DNA、黒矢印: 特異的プライマーによる増幅DNA

以上の結果から、本研究で構築した PCR-CAPS 法及び特異的 PCR 法による識別法は、いずれも函館産と海外産を識別できることが示されたが、レトルト食品などの高温で処理された加工食品への適応性は、特異的 PCR 法の方が高いことが分かった。

4. まとめ

本研究により、以下の成果を得ることができた。

(1) 函館産及び海外産のダルスについて、COX1 遺伝子の塩基配列を比較した結果、函館産に特徴的な塩基配列及び制限酵素切断部位の存在を確認した。

(2) 海外産と函館産の識別法として PCR-CAPS 法及び特異的 PCR 法を利用した 2 種類の方法を構築した。また、特異的 PCR 法は、PCR-CAPS 法に比べてレトルト食品などの高温で処理された加工食品への適応性が高いと考えられた。本研究で構築した識別法は、様々な種類の加工品に利用できると予想しており、今後、函館産ダルス及び関連製品のブランド力の強化に貢献できるものと期待している。

参考文献

1) 岸村栄毅, 熊谷祐也, 安井 肇, 木下康宣, 清水健志. 海藻活用研究と商品開発. 第 1 刊、5-6 (2020) .